



## Caspase 9 活性检测试剂盒

### I. 产品信息

目录号: APC09

规格: 20T, 50T, 100T

保存: -20°C避光

效期: 一年

### II. 背景简介

Caspase 是近年来发现的一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶，它们的一个重要共同点是活性位点都含有半胱氨酸，并特异地断开天冬氨酸残基后的肽键。Caspase 一词是从 Cysteine aspartic acid specific protease 的缩写衍生而来，就反映了这个特征，而这种高度的特异性，在蛋白酶中是很少见的。细胞中合成的 caspase 以无活性的酶原状态存在，经活化方能执行其功能。

Caspase 9 是细胞凋亡信号转导过程中比较上游的一个 Caspase，在正常状态下以酶原的形式存在，没有活性，在细胞凋亡的信号转导中被激活。线粒体释放细胞色素 c 以后，Caspase 9 可以和细胞色素 c 以及 Apaf1 形成复合物，同时被激活。激活的 Caspase 9 可以激活细胞凋亡最关键酶 Caspase 3，从而促进后续的细胞凋亡信号。

本产品基于 Caspase 9 催化底物 Ac-LEHD-pNA 产生黄色的 pNA (p-nitroaniline)，测定 pNA 在 405 nm 吸光度的原理，检测 Caspase 9 的活性。试剂盒提供的 pNA 可作为定量 Caspase 9 活性的标准品。当使用酶标仪检测或容量不超过 100  $\mu$ l 的分光光度检测杯检测时，除标准曲线外可以检测 20 个样品(20T)或 100 个样品(100T)。

### III. 试剂盒组分

组分	目录号	APC09-20	APC09-50	APC09-100
	规格	20 T	50 T	100 T
细胞裂解液		5 ml	12.5 ml	25 ml
检测缓冲液		5 ml	12.5 ml	25 ml
底物 Ac-LEHD-pNA (2mM)		200 $\mu$ l	100 $\mu$ l $\times$ 5	200 $\mu$ l $\times$ 5
pNA (10mM)		200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml

### IV. 未提供的设备和材料

1. 水浴锅或恒温箱
2. 酶标仪或分光光度计(100  $\mu$ l 的比色皿)
3. 冰
4. 96 孔板
5. 1 $\times$ PBS
6. 涡旋振荡器
7. Bradford 法蛋白定量试剂盒(也许需要)
8. 玻璃匀浆器(也许需要)

### V. 使用方法

#### 一、准备工作

将细胞裂解液和检测缓冲液放置于 4°C 融化后混匀，并置于冰上备用。

#### 二、pNA 标准曲线制备

1. 标准品稀释液的配制：按照检测缓冲液：细胞裂解液= 9:1 的比例配制适量的标准品稀释液。
2. 用标准品稀释液稀释 pNA (10 mM)，使 pNA 浓度分别为 200  $\mu$ M、100  $\mu$ M、50  $\mu$ M、20  $\mu$ M、10  $\mu$ M、0  $\mu$ M，把以上系列浓度物质作为标准品。

Product For Research Use Only rev: APC09-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: order@liankebio.com



3. 取 pNA 浓度分别为 200  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、0  $\mu\text{M}$  的标准品各 100  $\mu\text{l}$  加入 96 孔板或取适量体积加入至容量不超过 100  $\mu\text{l}$  的分光光度检测杯检测，测定 405 nm 处吸光值即  $A_{405}$ 。
4. 每一个标准品检测的  $A_{405}$  减去不含 pNA 的空白对照的  $A_{405}$ ，计算出实际的 pNA 吸光值。以 pNA 浓度为 x 轴，以对应的每个浓度的标准品  $A_{405}$  为 y 轴，制作 pNA 浓度对应  $A_{405}$  值的标准曲线(pNA 标准曲线见结果示例)。

### 三、样本制备

1. 对于悬浮细胞、贴壁细胞或组织样本，可按照下列方法制备：

- 1a. 对于悬浮细胞：

取没有诱导凋亡的对照组样品和诱导凋亡组样品，2000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 分钟收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS 洗涤一次，小心吸除上清。按照每 200 万细胞加入 100  $\mu\text{l}$  细胞裂解液的比例，加入细胞裂解液，重悬细胞沉淀，冰浴裂解 30 分钟，其间涡旋振荡 3 - 4 次，进入步骤 2。

- 1b. 对于贴壁细胞：

弃细胞培养基，PBS 洗涤一次，加入适量的胰酶消化收集细胞，2000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 分钟，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，PBS 洗涤一次，小心吸除上清。按照每 200 万细胞加入 100  $\mu\text{l}$  细胞裂解液比例加入细胞裂解液，重悬细胞沉淀，冰浴裂解 30 分钟，其间涡旋振荡 3 - 4 次，进入步骤 2。

- 1c. 对于组织样本：

按照每 5 - 10 mg 组织加入 100  $\mu\text{l}$  细胞裂解液的比例，加入细胞裂解液，在冰上用玻璃匀浆器匀浆。然后把匀浆液转移到 1.5 ml 离心管中，冰浴裂解 5 - 10 分钟。进入步骤 2。

2. 12000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 分钟，取上清至预冷的 1.5 ml 离心管。立即测定 Caspase 9 酶活性或者 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存样本。
3. 蛋白定量(可选)：由于细胞裂解液含有还原剂，不宜采用 BCA 法，可采用 Bradford 法测定蛋白浓度，尽量使蛋白浓度达到 1 - 3 mg/ml。

### 四、Caspase 9 活性检测

1. 取出适量 Ac-LEHD-pNA(2 mM)和检测缓冲液，置于冰上备用。
2. 如下设置反应体系：

	空白对照	样本
检测缓冲液	40 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
细胞裂解液	50 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
待测样本	0 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
Ac-LEHD-pNA(2 mM)	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
总体积	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$

3. 在设置反应体系，溶液应按顺序依次加入，即先加检测缓冲液，再加细胞裂解液或待测样本，适当混匀，再加入 Ac-LEHD-pNA(2 mM)，注意避免在混匀时产生气泡。
4. 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 - 4 小时。发现颜色变化较明显时即可测定  $A_{405}$ 。如果颜色变化不明显，可适当延长孵育时间，甚至可以孵育过夜。
5. 待测样品  $A_{405}$  减去空白对照  $A_{405}$ ，即为样品中 Caspase 9 水解底物产生的 pNA 产生的吸光值，根据标准曲线可以计算出样品中水解产生多少量的 pNA。

Product For Research Use Only rev: APC09-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: order@liankebio.com

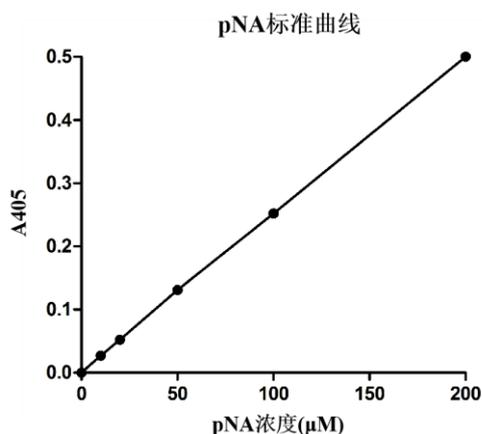


6. 用 Bradford 法检测待测样本中蛋白浓度(由于裂解液中含有较高浓度的 DTT, 不适合采用 BCA 法进行蛋白浓度测定), 计算出一个样本单位重量蛋白中所含的 Caspase 9 的酶活力单位即 Caspase 9 酶活力单位。
7. Caspase 9 酶活性的另外一种表示方法是 Caspase 活性增加的百分比, 即实验处理组  $A_{405}$ /实验对照组  $A_{405} \times 100\%$ , 可粗略地反映酶活性情况。
8. 参考 Chemicon 公司的 Caspase 9 酶活力单位的定义: one unit is the amount of enzyme that will cleave 1.0 nmol of the colorimetric substrate Ac-LEHD-pNA per hour at 37°C under saturated substrate concentrations. 即一个酶活力单位定义为: 当底物饱和时, 在 37°C 一个小时内可以剪切 1 nmol Ac-LEHD-pNA 产生 1 nmol pNA 的 Caspase 9 的酶量。这样就可以计算出样本中含有多少个酶活力单位的 Caspase 9。  
注: 在本试剂盒的检测体系中, 底物的起始浓度为 0.2 mM, 此时底物是饱和的, 对于大部分样本而言在 37°C 孵育 2 小时内底物都是饱和的; 对于样品中 Caspase 9 酶活力特别高的情况, 用细胞裂解液适当稀释样品后再进行检测。

## V. 结果示例

### 1. pNA 标准曲线

$\mu\text{M}$	$A_{405}$		Average	Corrected
200	0.544	0.538	0.541	0.500
100	0.295	0.292	0.294	0.252
50	0.173	0.172	0.173	0.131
20	0.094	0.093	0.094	0.052
10	0.068	0.068	0.068	0.027
0	0.041	0.042	0.042	0.000



### 2. HL60 细胞经 10 $\mu\text{M}$ 喜树碱诱导 4 h, 检测 Caspase 9 酶活性变化

	$A_{405}$		Average	Corrected
空白对照组	0.044	0.046	0.044	0.000
实验对照组	0.122	0.122	0.123	0.078
实验组	0.348	0.350	0.343	0.302

注: 实测数据可能因实验条件、仪器等的不同而存在差异, 数据仅供参考。

## VI. 注意事项

1. 自备可以测定 405 nm 或 400 nm 的酶标仪或容量不超过 100  $\mu\text{l}$  的比色皿及相应分光光度计。优先考虑测定  $A_{405}$ , 其次  $A_{400}$ 。
2. Ac-LEHD-pNA 和 pNA 尽量避免反复冻融, 可以适当分装避光保存。
3. 测定蛋白浓度需 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(PQ0041), 可向联科生物订购。
4. 本试剂盒的细胞裂解液可以和本公司生产的其他 Caspase 活性检测试剂盒的细胞裂解液通用, 本试剂盒细胞裂解液制备的蛋白样本可以用于本公司其它 Caspase 活性检测试剂盒的检测。



5. 若测定 A<sub>405</sub> 过低, 可能样品中有效蛋白含量太低或 Caspase 激活水平过低, 应注意使蛋白浓度尽量达到 1 - 3 mg/ml, 调整诱导凋亡的时间和条件, 找到一个 Caspase 激活比较强的时间点或条件。若测定 A<sub>405</sub> 过高, 可以适当减少样品的用量, 用细胞裂解液补足至总体积 50 μl 再检测。
6. 若样本量不足 50 μl, 用细胞裂解液补足至总体积 50 μl 再检测。
7. 为了您的安全和健康, 请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。
8. 更多凋亡相关产品敬请关注联科生物网站或来电咨询。

## VII. 部分相关产品

目录号	产品名称	规格
AP101	Annexin V-FITC/PI apoptosis kit	30T/60T/100T
AP104	Annexin V-PE/7-AAD apoptosis kit	30T/60T/100T
AP105	Annexin V-APC/7-AAD apoptosis kit	30T/60T/100T
AP107	Annexin V-APC/PI apoptosis kit	30T/60T/100T
AP108	Annexin V-EGFP/PI apoptosis kit	30T/60T/100T
AP109	Annexin V-EGFP/7-AAD apoptosis kit	30T/60T/100T
AP-30-PCS	Apoptosis Positive Control Solution	5 ml
APC03	Caspase 3 活性检测试剂盒	20T/100T
APC08	Caspase 8 活性检测试剂盒	20T/100T
APO001	Direct TUNEL Apoptosis Assay Kit	50T
AT001	Accutase 酶	100 ml
AT101	Annexin V-FITC/PI apoptosis kit(贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT104	Annexin V-PE/7-AAD apoptosis kit(贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT105	Annexin V-APC/7-AAD apoptosis kit(贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT107	Annexin V-APC/PI apoptosis kit(贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT108	Annexin V-EGFP/PI apoptosis kit(贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
AT109	Annexin V-EGFP/7-AAD apoptosis kit(贴壁细胞专用)	30T/60T/100T
CCS012	Cell cycle staining Kit	50 T
MJ101	Mitochondria Staining Kit (JC-1)	125 T
PQ004	Bradford 法蛋白检测试剂盒	500T/1000T